第 36 卷 第 2 期
1993 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 36, No. 2
May. 1993

阿特拉津和敌敌畏对棉铃虫和家蝇羧酸酯酶以及 GSH-S-转移酶的诱导作用*

高希武 梁同庭**
(北京农业大学植保系,北京 100094)

摘要: 在一定时间内,阿特拉津 (Atrazine) 对棉铃虫 *Heliothis armigera* 幼虫羧酸酯酶以及 GSH-S-转移酶 (GST) 活性有明显的诱导作用,羧酸酯酶活性最高增加 146%,GST 增加 280%。对羧酸酯酶的诱导高峰时间要落后于 GST,不同施药剂量的诱导高峰时间以及诱导增加的量也不相同。敌敌畏对家蝇 *Musca domestica vicina* GST 活性没有明显的诱导作用,阿特拉津对家蝇 GST 活性也没有产生诱导作用。

关键词 棉铃虫 家蝇 羧酸酯酶 GSH-S-转移酶 诱导作用

在田间条件下,害虫可能接触到各种类型的化合物(例如杀虫剂、杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂等),现在已经证明了杀菌剂(丙氯灵)(Johnston 等,1989)、除草剂(阿特拉津)(Liang 等,1974; Lichtenstein 等,1973)等可以影响杀虫剂的杀虫活性。Lichtenstein 等(1973)证明了阿特拉津、西玛津、灭草隆和 2,4-D 等可以改变对硫磷、DDT、二嗪哝、氧化二嗪哝、甲拌磷、呋喃丹和狄氏剂等杀虫剂对果蝇 *Drosophia melanogaster*、家蝇 *Musca domestica* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的毒杀效果。但是,造成这种影响的生物化学机制还未见报道。羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 是昆虫体内对杀虫药剂解毒的两类重要酶系 (Dauterman, 1976、1983),已知有多种化合物对昆虫和高等动物的解毒酶系可以产生诱导作用,目前,已经发现至少有 12 种昆虫的解毒酶系是可诱导的 (Dauterman, 1983)。本文主要是以棉铃虫 *Heliothis armigera* 和家蝇为试验材料来证明除草剂对昆虫体内羧酸酯酶和 GST 活性的影响,进而探索非杀虫药剂和杀虫剂对昆虫的相互作用。

材 料 与 方 法

1. 化学试剂 阿特拉津 (Atrazine) 含量 99%,Ciba-Geigy 公司提供。谷胱甘肽 (GSH)为 Sigma 公司产品。1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)为 Sigma 公司产品。α-乙酸萘酯(α-NA) 为上海试剂一厂产品。固蓝 B 盐为 Fluka 公司产品。碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh),含量 99% 和毒扁豆碱,含量 99% 为 Fluka 公司产品。5,5′-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB)为 Roth 公司产品。其它试剂为分析纯或化学纯。

2. 供试虫源 家蝇在室内用人工饲料饲养,属于对有机磷杀虫剂具抗性的品系。棉

本文于 1991 年 6 月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。
** 北京农业大学客座教授。

铃虫采自田间种群,用人工饲料饲养,光照 16 小时,温度为 28℃,以 F_2 代幼虫为试验材料。

3. 试验方法 (1)给药方法:采用点滴施药法或培养基混药法(以死亡率为 0 或低于 5%的剂量为施药剂量)。(2)酶液的提取:将待匀浆的棉铃虫用流动的蒸馏水冲洗 2 分钟,然后放在滤纸上吸干,在 4℃ 解剖,去掉消化道中食物。按 50mg/ml 磷酸缓冲液 (pH 7.0,0.04mol/L) 匀浆,在 3 000g 离心 10 分钟后,取上清液用于测定羧酸酯酶活性。按 500mg/ml 磷酸缓冲液 (pH6.5,0.1mol/L) 匀浆,然后在 4℃,6 000g 离心 15 分钟,取上清液用于测定 GSH-S-转移酶活性。测定乙酰胆碱酯酶的酶源与 GSH-S-转移酶相同,只是将缓冲液改为 pH7.5,0.1mol/L。(3)羧酸酯酶活性测定:按 Asperen (1962) 方法。3.6ml α-乙酸萘酯 (3×10^{-4}mol/L,含 3×10^{-4}mol/L 毒扁豆碱,1% 丙酮),加适量酶液,在 30℃ 反应 15 分钟后,加 1ml DBLS 试剂(1%固蓝 B 盐水溶液与 5%十二烷基硫酸钠水溶液在使用前以 2:5 混合),15 分钟后在波长 600nm 测光密度值。(4)谷胱甘肽-S-转移酶 (GSH-S-转移酶)测定:按 Habig 等(1981) 方法,反应总体积 3ml(pH6.5,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液),含 CDNB12.2μg,GSH46.1μg,酶液适量,在 25℃ 用 UV-190 分光光度计在 340nm 记录 3 分钟光密度值,计算酶活性(消光系数为 9.6nmol^{-1}, cm^{-1})。(4)蛋白质含量测定:参照 Bradford(1976) 方法。

结 果 与 讨 论

一、阿特拉津对棉铃虫幼虫羧酸酯酶活性的诱导作用

表 1 显示出点滴处理后不同时间羧酸酯酶活性的变化。在施药剂量为 2.1μg/头时,在点滴处理后 24 小时,酶活性即增加 21.1%;48 小时后达到高峰,增加约 41%;在 72 小时为 30.2%。说明外来化合物对棉铃虫羧酸酯酶的诱导具有时间性。

表 1 阿特拉津对棉铃虫四龄幼虫羧酸酯酶的诱导作用(1)

剂 量	24 小时	48 小时	72 小时(2)
对照	246.7±33.3	234.4±11.9	210.91±15.9
2.1μg/头	298.7±12.2	329.7±30.8	274.6±17.9
酶活性%(3)	21.1%	40.7%	30.2%

(1) 酶活性单位为 μmolα-NA/mg 蛋白 15 分钟。
(2) 处理后时间。
(3) 酶活性增加%=(处理-对照)/对照×100。

用含有 20ppm 阿特拉津的人工饲料饲养棉铃虫初孵幼虫,测定三龄幼虫的羧酸酯酶活性,处理组活性增加 146.4%,说明培养基混药法(包括接触和通过消化道进入)对酶的诱导作用要比一次性点滴处理高得多(表 2)。

关于外来化合物对羧酸酯酶诱导作用的报道并不多,到目前为止仅见久效磷使烟草天蛾 *Manduca sexta* 羧酸酯酶活性提高 2 倍;双硫磷使致乏库蚊 *Culex quinquefasciatus* 羧酸酯酶活性提高 12.8%(刘维德等,1984)。此外,发现保幼激素类似物 ZR-512 以及一些植物次生性物质对羧酸酯酶具有诱导作用 (Dauterman, 1976、1983; Terriere,1983)。

表 2 阿特拉津对棉铃虫羧酸酯酶和 GST 的诱导作用

	GST 活性(×10⁻²)(1)	羧酸酯酶活性(2)
对照	6.4±0.5	347.8±34.8
处理(3)	14.0±0.6	857.1±50.0
酶活性%	118.8%	146.4%

(1) 活力单位/mg 蛋白·分钟在 25℃。
(2) μmolα-NA/mg 蛋白·分钟。
(3) 用含有 20ppm 阿特拉津的人工饲料饲养初孵幼虫 8 天后测定酶活性。

二、阿特拉津对棉铃虫幼虫 GST 的诱导作用

阿特拉津对棉铃虫幼虫 GST 的诱导作用与羧酸酯酶类似，在点滴剂量为 0.5μg/头 48 小时，诱导 GST 增加 40.9%；到 72 小时对照与处理组活性接近。在点滴剂量为 2.1 μg/头处理后 24 小时，酶活性增加 280%，到 48 小时，对照与处理组酶活性相等（表 3）。这种现象与对羧酸酯酶的诱导趋势相同，只是对 GST 的诱导高峰时间比羧酸酯酶要早。说明阿特拉津对 GST 的诱导反应要比羧酸酯酶快，这可能与 GST 对阿特拉津或其代谢物有较强的轭合作用有关。

表 3 阿特拉津对棉铃虫 GST 活性的诱导作用(1)

剂 量	24 小时	48 小时	72 小时(2)
对照	—	3.2±0.6	3.8±0.5
0.5μg/头	—	4.5±0.5	3.5±0.5
酶活性%(3)	—	40.9%	−7.9%
对照	2.5±0.8	2.5±0.2	—
2.1μg/头	9.5±0.3	2.5±0.2	—
酶活性%(3)	280%	0%	—

(1) 活力单位/mg 蛋白·分钟×10⁻²，25℃。
(2) 处理后时间。
(3) 同表1。

用 20ppm 阿特拉津的人工饲料饲喂棉铃虫初孵幼虫，测定三龄幼虫的酶活性，处理组 GST 活性明显高于对照组，增加 118.8%（表 2）。

三、阿特拉津对家蝇 GST 和乙酰胆碱酯酶（AChE）的影响

用含有 20 ppm 阿特拉津的饲料饲养家蝇幼虫，对羽化后两天的成虫进行酶活性测定。结果表明，处理组与丙酮对照组 GST 活性没有明显差异。但是，处理组与对照组家蝇对有机磷杀虫剂的反应确有明显差异，以浓度为 3.47×10^{-6}mol/L 的对氧磷对处理组家蝇 AChE 的抑制率仅 8.1%，而对丙酮对照组的抑制率达 33.8%，相差近 4 倍。说明家蝇幼虫取食含有阿特拉津的饲料，成虫中的 AChE 对对氧磷的敏感度降低了，这与生物测定结果也是一致的。按 1.75μg/头家蝇点滴对硫磷，阿特拉津处理组死亡率仅为 4%，而丙酮对照组却死亡 45%（表 4）。说明外来化合物除了可能对解毒代谢酶系有影响外，也可能使有机磷杀虫药剂的靶标酶（AChE）的敏感度降低。关于这种现象还未见报道，只是发现萘能够使家蝇对残杀威的耐性提高约 2 倍（Terriere，1983）。

表 4 阿特拉津对家蝇 GST 和 AChE 影响

	对硫磷(1.75μg/头)死亡率[3]	对氧磷(3.47 × 10^{-6}mol/L)抑制 AChE%	GST 活性(×10^{-2})[1]
对照	45%	33.8%	25.0±1.2
处理	4%	8.1%	23.0±0.9

(1) 活力单位/mg 蛋白·分钟,25℃。
(2) 用 20ppm 的阿特拉津饲养家蝇幼虫对羽化后两天的成虫进行上述测定。
(3) 24 小时死亡率。

四、敌敌畏对家蝇成虫 GST 的诱导作用

用含有 100 ppm 敌敌畏的人工饲料饲喂羽化后一天的家蝇成虫，在不同时间测定 GST 活性。敌敌畏对家蝇成虫 GST 活性没有诱导增加而有抑制作用，在 24 小时降低约 24%(表 5),这与上述阿特拉津未能使家蝇 GST 活性增加是一致的。

表 5 敌敌畏对家蝇成虫 GST 活性的诱导作用[1]

	0	24 小时	48 小时
对照	18.0±0.1	21.0±0.5	17.0±0.4
处理[2]	—	16.0±1.0	17.0±1.0
酶活性%	—	−23.8%	0%

(1) 活力单位/mg蛋白·分钟×10^{-2},25℃。
(2) 同表 5。

参 考 文 献

刘维德、G.P.乔治欧 1983 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊酯酶活性增强的初步研究。昆虫学研究集刊 第三集 65—72 页,上海科学出版社。

Asperen van, K. 1962 A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401—16.

Bradford, T. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *An. Bioch.* 72: 248—54.

Dauterman, W. C. 1976 Insecticide Biochemistry and Physiology. Edited by Wilkinson, C. F. p149—176, Plenum Press.

Dauterman, W. C. 1983 Pest Resistance to Pesticides. Edited by Georghiou, G. P. & Saito, T. p229—248, Plenum Press.

Habig, W. H. et al. 1981 Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In Methods in Enzymology. Vol 77: 398—405. Edited by William, B. J. Academic Press.

Johnston, G. et al. 1989 Enhancement of malathion toxicity to the hybrid red-legged partridge following exposure to prochloraz. *Pestic. Bioch. Physiol.* 35: 107—18.

Liang, T. T. et al. 1974 Synergism of insecticides by herbicides: Effect of environmental factors. *Science* 186: 1128—30.

Lichtenstein, E. P. et al. 1973 Synergism of insecticides by herbicides. *Science* 181: 847—9.

Terriere, L. C. 1983 Pest Resistance to Pesticides. Edited by Georghiou, G. P. & Saito, T. p265—297, Plenum Press.

INDUCTION OF CARBOXYLESTERASE AND GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVITIES BY ATRAZINE AND DICHLORVOS IN LARVAE OF *HELIOTHIS ARMIGERA* AND *MUSCA DOMESTICA VICINA*

Gao Xi-wu Liang Tong-ting

(Department of Plant Protection, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Dilute solutions of atrazine and dichlorvos were used to treat the larvae of cotton bollworm *Heliothis armigera* and housefly *Musca domestica vicina* by topic application or mixing them with the diets for rearing the larvae. The activities of carboxylesterase (CarE) and glutatione-S-transferase (CST), using the supernatant protions of the homogenates of the larvae, were determined according to the methods of Asperen (1962) and Habig et al (1981) respectively. The results showed that atrazine induced GarE and GST activities significantly in the cotton bollworm to about 146% and 280% respectively. The peak of CarE activity induced by atrazine appeared earlier than that of GST. Both the time and magnitude of CarE or GST activity varied with the amount of atrzine used in the topic application. In the larvae of housefly, dichlorvos was very poor inducer of CarE or GST activity and atrazine could not increase GST activity.

Key words *Heliothis armigera*——*Musca domestica vicina*——carboxylesterase——glutathione-S-transferase——enzymic induction